



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :  A61K 9/51		(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 93/25194</b>
A1		(43) Date de publication internationale: 23 décembre 1993 (23.12.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00593		(74) Mandataire: LE GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75414 Paris Cedex 09 (FR).
(22) Date de dépôt international: 16 juin 1993 (16.06.93)		(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Données relatives à la priorité: 92/07285 16 juin 1992 (16.06.92)	FR	Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75007 Paris (FR).		
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SKIBA, Mohamed [MA/FR]; 12, chemin des Hauts Graviers, F-91370 Verrières-le-Buisson (FR). WOUESSIDJEW, Denis [CM/FR]; 90 b, avenue François-Molé, F-92160 Antony (FR). FESSI, Hatem [TN/FR]; 3, rue Friant, F-75014 Paris (FR). DEVISSAGUET, Jean-Philippe [FR/FR]; 14, boulevard d'Inckermann, F-92200 Neuilly-sur-Seine (FR). DUCHENE, Dominique [FR/FR]; 8 bis, rue Laurent-Picat, F-75116 Paris (FR). PLUISEUX, Francis [FR/FR]; 66, rue de Strasbourg, F-94700 Maisons-Alfort (FR).		
(54) Titre: PREPARATION AND USE OF NOVEL CYCLODEXTRIN-BASED DISPERSIBLE NANOVESICULAR COLLOIDAL SYSTEMS IN THE FORM OF NANOCAPSULES		
(54) Titre: PREPARATION ET APPLICATION DE NOUVEAUX SYSTEMES COLLOIDAUX NANOVESICULAIRES DISPERSIBLES A BASE DE CYCLODEXTRINE, SOUS FORME DE NANOCAPSULES		
(57) Abstract		
<p>A nanovesicular system prepared by (1) preparing a liquid phase essentially consisting of a solution of cyclodextrin modified by acyl groups, and an oil in an organic solvent or solvent mixture; (2) preparing a second liquid phase essentially consisting of water or an aqueous mixture optionally containing one or more surfactants, one of said phases (1) and (2) optionally having an active molecule added thereto; and (3) gently stirring one of the liquid phases resulting from (1) or (2) into the other in order to obtain, almost instantaneously, a colloidal solution of modified cyclodextrin nanocapsules containing oil and optionally said active molecule. If required, all or part of the solvent or solvent mixture and all or part of the water or aqueous mixture may be removed. Said system may be used as a carrier for pharmaceuticals, cosmetics, chemicals, etc.</p>		
(57) Abrégé		
<p>La préparation du système nanovésiculaire est caractérisée selon l'invention en ce que: (1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de cyclodextrine modifiée par des groupes acyle et d'une huile dans un solvant ou un mélange de solvants organiques(s); (2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par de l'eau ou un mélange aqueux, pouvant contenir un ou plusieurs surfactifs, l'une des phases (1) et (2) pouvant être additionnée d'une molécule active; (3) on ajoute sous agitation modérée, l'une des phases liquides obtenues sous (1) ou (2) à l'autre de manière à obtenir pratiquement instantanément une suspension colloïdale de nanocapsules de cyclodextrine modifiée contenant de l'huile et éventuellement la molécule active. Le cas échéant on élimine tout ou partie du solvant ou du mélange de solvants et de l'eau ou du mélange aqueux. Applications: vecteurs de produits pharmaceutiques, cosmétiques, chimiques, etc.</p>		

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japan	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CV	Sao-Tome	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SN	Sénégal
CN	Cameroon	LA	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchétchénie-avant	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

Préparation et application de nouveaux systèmes colloïdaux nanovésiculaires dispersibles à base de cyclodextrine, sous forme de nanocapsules.

---

5 La présente invention a pour objet la préparation et l'application d'un nouveau système colloïdal nanovésiculaire dispersible à base de cyclodextrine sous forme de particules sphériques de type vésiculaire de taille allant de 100 à 900 nm (nanocapsules), contenant une 10 molécule active.

Des systèmes nanovésiculaires, comprenant des nanocapsules et constitués d'un noyau central solide ou liquide enveloppé par une membrane continue insoluble ont déjà été décrits dans la littérature. Les constituants de 15 la membrane peuvent être des macromolécules synthétiques (polymères), naturelles (protéines), ou des lipides (liposomes).

Des particules de polymère, submicroniques sont déjà connues notamment d'après les brevets BE-A-808 034, BE-A-20 839 748, BE-A-869 107, FR-A-2 504 408, FR-A-2 515 960 et EP-A-0 274 961.

25 Selon BE-A-808 034 et -839 748, les particules submicroniques sont formées par polymérisation micellaire d'un monomère tel qu'un dérivé de l'acide acrylique. De même le BE-A-869 107, FR-A-2 504 408 et FR-A-2 515 960 décrivent la préparation de nanocapsules biodégradables obtenues par polymérisation d'un cyanoacrylate d'alkyle et contenant une substance biologiquement active. Les méthodes font appel à une polymérisation en solution et 30 sont donc limitées à l'utilisation d'un nombre limité de polymères pouvant être obtenus notamment par vinyl-addition et ne convient pas à des polymères naturels ou hémisynthétiques. De plus il est difficile de maîtriser le poids moléculaire constitutif des nanocapsules et il est nécessaire, notamment en vue d'usage biologique, 35 d'éliminer les monomères et oligomères résiduels, le cas

échéant les réactifs de polymérisation (initiateur et catalyseur) en excès, ainsi que les surfactifs s'ils sont utilisés à forte concentration ou ne sont pas biocompatibles. Or la purification des nanocapsules, vu leur taille, n'est pas toujours possible.

On a aussi décrit la préparation de nanocapsules protéiques, notamment de gélatine. Ainsi, Krause et coll. (Pharm. Research, 239 (1985)), obtiennent des nanocapsules de gélatine dont le contenu est lipophile (chloroforme), à partir d'une émulsion de chloroforme dans une phase continue aqueuse (solution d'albumine). Les nanocapsules sont ensuite durcies par le glutaraldéhyde, dont l'excès doit être détruit par du métabisulfite de sodium qui doit être éliminé. De plus, la stabilité du chloroforme dans la nanocapsule semble limitée par son évaporation : les nanocapsules peuvent se vider du solvant, mais conservent le produit lipophile initialement en solution dans le chloroforme.

EP-A-0 274 961 décrit un procédé de préparation de nanocapsules ayant une paroi polymère contenant une substance, par une méthode de désolvatation consistant à mélanger deux phases de solvants, l'un étant non-solvant de la substance mais soluble dans l'autre solvant.

Selon la présente invention, on propose comme matière de base des cyclodextrines modifiées préparées par acylation de cyclodextrines naturelles. Elles ont l'avantage d'être biodégradables, leur administration est suivie d'une libération de la molécule active, et il est possible d'obtenir une biodégradabilité, convenablement programmée en faisant appel à des cyclodextrines modifiées différant entre elles par la nature de la chaîne alkyle du groupe acyle utilisé.

De telles cyclodextrines modifiées et leur préparation sont notamment décrites par Ping Zhang, Chang-Chun Ling, A.W Coleman, H.Parrot-Lopez et H.Galons dans Tetr. Lett. 32, n°24 pp.2769-70, 1991.

L'invention a pour objet un procédé de préparation d'un système colloidal dispersible à base de cyclodextrine sous forme de nanocapsules, caractérisé en ce que

5        1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de cyclodextrine modifiée par des groupes acyle et d'une huile dans un solvant ou mélange de solvants organique(s) contenant ou non un surfactif et pouvant être additionnée d'une molécule active,

10      2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par de l'eau ou un mélange aqueux, contenant ou non un surfactif et pouvant être additionnée d'une molécule active, et

15      3) on ajoute sous agitation modérée, l'une des phases liquides obtenues sous (1) ou (2) à l'autre, de manière à obtenir pratiquement instantanément une suspension colloïdale de nanocapsules dont la paroi est constituée de cyclodextrine modifiée et la cavité est constituée d'huile contenant le cas échéant la molécule active.

20      Si l'on désire, on élimine tout ou une partie du solvant ou du mélange de solvants et de l'eau ou du mélange aqueux, de manière à obtenir une suspension colloïdale de concentration voulue en nanocapsules ou une poudre de nanocapsules.

25      La cyclodextrine modifiée utilisée selon l'invention est notamment une cyclodextrine dont les groupes hydroxy, de préférence les hydroxy secondaires de chaque unité glucose la formant ont été estérifiés par un groupe acyle aliphatique ou aromatique pouvant être substitués par un ou plusieurs groupements fonctionnels, telle qu'une bêta-cyclodextrine acylée par un groupe alcanoyle de 2 à 20 atomes de carbone, notamment 6 à 14 atomes de carbone. Ces produits sont décrits par Ping Zhang et coll. précité.

La molécule active peut être un principe médicamenteux, un réactif biologique, un principe cosmétique, ou un produit chimique. L'invention permet 5 d'obtenir des nanocapsules de cyclodextrine modifiée contenant l'huile (utilisables telles quelles) ou comprenant de plus cette molécule active.

Le solvant organique dans la phase (1) peut être un alcool tel que méthanol, éthanol, isopropanol, 10 etc... ou une cétone telle que l'acétone.

L'huile peut être une huile végétale ou minérale, ou toute substance huileuse, par exemple l'huile d'olive, le benzoate de benzyle, le myristate d'isopropyle, des glycérides d'acide gras, (p.ex. un 15 Miglyol (R)), l'huile de bouquet ou autre. La proportion d'huile/cyclodextrine modifiée est de préférence entre 1/1 et 100/1 V/P.

L'eau ou un mélange aqueux (eau salée, acidifiée, basifiée etc...) est le non-solvant dans la 20 phase (2).

Le procédé peut être réalisé à différentes températures (qui influent peu sur son déroulement), notamment entre 0°C et la température d'ébullition des solvants.

25 Le rapport des volumes phase (1)/phase (2) peut varier préférentiellement de 0,1 à 1.

Le(s) surfactif(s) est (sont) présent(s) notamment en une proportion de 0,1 à 10 %, de préférence 0,2 à 2 % en poids de la suspension colloïdale obtenue dans 30 l'étape 3.

On entend par agitation modérée une agitation suffisante pour homogénéiser le mélange des phases (1) et (2), par exemple au moyen d'un barreau magnétique à 35 50-500 rpm, par exemple 100 rpm. Elle n'est pas indispensable pour de faibles quantités de produit.

Finalement, la suspension colloïdale de nanocapsules peut être à volonté concentrée, stérilisée,

tamponnée (par exemple au pH physiologique), et lyophilisée.

L'invention permet d'obtenir des nanocapsules de cyclodextrines de 100 à 900 nm notamment de 100 à 500 nm selon les conditions opératoires.

Les nanocapsules de la présente invention contrairement aux nanocapsules formées seulement de polymère, présentent l'avantage de permettre un taux d'incorporation nettement plus élevé. Ceci est dû à la possibilité de double charge, en premier lieu, une charge au sein de la capsule et en second lieu dans la cavité de la cyclodextrine à condition que la molécule invitée ait une conformation convenable par rapport à la cavité.

De plus, pour les nanocapsules faisant l'objet de la présente invention, la préparation a l'avantage d'être réversible, on peut solubiliser les nanocapsules et préparer les nanocapsules à partir de cette solution suivant le mode opératoire.

Les nanocapsules obtenues suivant l'invention se présentent au microscope électronique à transmission, après cryofracture sous la forme de capsules sphériques.

L'enveloppe externe des nanocapsules contenant une huile ou une substance active dispersée dans une huile apparaît sous forme de paroi d'épaisseur très régulière de l'ordre de quelques nanomètres. La paroi n'est pas formée par polymérisation.

Le taux d'encapsulation est toujours très élevé dans le cas de produits lipophiles ; 200 mg de cyclodextrine modifiée permet par exemple d'encapsuler 3 ml de benzoate de benzyle ou 230 mg de progestérone et 0,6 ml d'huile utilisée comme support.

Les substances actives insolubles dans les solvants organiques, et solubles dans l'eau peuvent également être encapsulées. Il suffit qu'elles présentent une certaine affinité pour la phase lipophile ; le

procédé de préparation des nanocapsules est analogue. Il suffit de solubiliser la substance active dans la phase aqueuse. Le taux d'encapsulation dépend du coefficient du partage de la substance active et de sa lipophilie.

5 Les nanocapsules de l'invention, contenant une huile, sont stables à l'autoclavage pendant plus de 15 min. à 120°C.

10 Les nanocapsules de l'invention sont stables à l'ultracentrifugation. Après une ultracentrifugation à 220 000 g pendant 2 h 30 min., la majeure partie des nanocapsules peut être facilement redispersée dans l'eau.

15 Les résultats précédents ne peuvent s'expliquer que par la présence d'une paroi enveloppant le matériel encapsulé et que par encapsulation complète du principe actif.

La substance active, contenue dans les nanocapsules de l'invention, peut être par exemple une molécule médicamenteuse à usage humain ou vétérinaire ou un produit pour le diagnostic. Comme molécule médicamenteuse, on peut citer plus particulièrement les produits chimiques doués de propriétés pharmacologiques et par exemple, les substances antimitotiques ou antinéoplasiques comme la méthotréxate, l'actinomycine D, l'adriamycine, la daunorubicine, la bléomycine, et la vincristine ou les substances antibiotiques comme les pénicillines, les céphalosporines et l'acide nalidixique, les antibiotiques du type aminoglycoside et ceux de la famille de la virginiamycine et les substances hormonales, notamment les hormones stéroïdiennes. Ces molécules médicamenteuses peuvent être notamment des composés chimiques à haut poids moléculaire comme l'insuline et l'héparine et l'expression "molécule médicamenteuse" comprend également des produits biologiques comme les antigènes, les enzymes, les protéines, les virus ou des constituants de virus, de bactéries ou de

cellules. Les nanocapsules suivant l'invention peuvent également contenir un produit pour le diagnostic comme par exemple la fluorescéine et la séralbumine humaine radio-active. Les nanocapsules suivant l'invention peuvent également contenir un produit pour le diagnostic, notamment des produits radio-opaques lipophiles tels que les huiles iodées.

En médecine humaine ou vétérinaire, les nanocapsules de l'invention peuvent être utilisées comme vecteurs de médicaments administrés avec ou sans excipient adéquat par voie orale, sous cutanée, intradermique, intramusculaire ou intraveineuse et leur diffusion dans les tissus les rend particulièrement intéressantes pour les traitements par voie générale.

Théorie de l'encapsulation : Dans le solvant par exemple dans l'éthanol absolu, la substance huileuse et la cyclodextrine forment une solution vraie. La cyclodextrine modifiée possède des propriétés tensioactives grâce à sa structure particulière. L'huile est complètement lipophile. Le stade important de la préparation est l'injection lente de la solution contenant l'huile et la cyclodextrine dans la phase aqueuse. L'alcool absolu possède une affinité considérable pour l'eau et, au moment du contact, il se mélange rapidement avec cette dernière en dégageant une certaine quantité de chaleur (appelée chaleur du mélange). La substance huileuse précipite en formant des petites particules de l'ordre du nanomètre. A ce moment les molécules de cyclodextrine s'orientent grâce à leur polarité en formant un film qui enrobe complètement les nanoparticules d'huile. En présence d'eau le film est constitué par les têtes hydrophiles des molécules de cyclodextrine stabilisées par des liaisons hydrogène à la surface des nanoparticules. Le rôle du surfactif utilisé est plus ou moins important. Il est possible d'obtenir des nanocapsules

dans de l'eau sans surfactif. Toutefois les nanocapsules ainsi obtenues s'agglomèrent rapidement dans le cas où il est intéressant de concentrer, en formant des agrégats difficiles à redisperser.

5 L'invention est illustrée par les exemples suivants :

Exemple 1

Préparation de nanocapsules de cyclodextrine modifiée à 6 carbone.

10 On utilise une bêta-cyclodextrine dont les OH secondaires des unités glucose le formant ont été estérifiés par des groupes hexanoyle, préparée selon Ping Zhang et coll.

Phase 1

15	bêta-cyclodextrine modifiée à 6 C	50 mg
	acétone	50 ml
	benzoate de benzyle	0,5 ml

Phase 2

20	Pluronic (R) F68	62,5 mg
	eau déminéralisée ou distillée	25 ml

La phase 1 est ajoutée sous agitation magnétique à la phase 2. Le milieu devient immédiatement opalescent par formation de nanocapsules de cyclodextrine modifiée. La taille moyenne des nanocapsules mesurée par un diffractomètre à rayon laser (Nanosizer (R) de chez Coultronics) est de 300 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,08.

30 La suspension peut être concentrée sous pression réduite au volume désiré, par exemple 5 ml ou plus ou moins.

35 Après un repos prolongé (14 mois), l'aspect de la suspension de nanocapsules demeure inchangé et on n'observe, en particulier, ni sédimentation irréversible, ni variation de la taille des nanocapsules.

**Exemple 2 : (variante de l'exemple 1)**

On procède comme dans l'exemple 1, mais en ajoutant la phase aqueuse à la phase acétonique. Les 5 nanocapsules obtenues présentent les mêmes caractéristiques que dans l'exemple 1.

**Exemple 3 : (variante de l'exemple 1)**

On procède comme dans l'exemple 1, mais en 10 ajoutant la phase acétonique à la phase aqueuse sans agitation du milieu. Les nanocapsules obtenues ont une taille de 300 nm avec un indice moyen de dispersion 0,5.

**Exemple 4 : (variante de l'exemple 1)**

On procède comme dans l'exemple 1, mais sans 15 ajouter d'agent de surface à la phase aqueuse. Les nanocapsules ont une taille de 500 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,6.

**20 Exemple 5**

Préparation stérile de nanocapsules de cyclodextrine modifiée à 6 carbone.

On procède comme dans l'exemple 1, puis la suspension est stérilisée à l'autoclave à 120°C pendant 25 15 minutes. La taille moyenne des particules demeure pratiquement inchangée après stérilisation.

**Exemple 6**

Préparation lyophilisée de nanocapsules de cyclodextrine modifiée à 6 carbone.

On procède comme dans l'exemple 1, puis la suspension est lyophilisée. L'addition d'un cryoprotecteur (maltose, tréhalose...etc) n'est pas indispensable. La taille moyenne des particules mesurée juste après la 30 lyophilisation demeure inchangée.

**Exemple 7**

Préparation de nanocapsules de cyclodextrine modifiée à 12 carbone.

5 On procède comme dans l'exemple 1, en remplaçant la cyclodextrine modifiée à 6 carbone par la cyclodextrine modifiée à 12 carbone, c'est-à-dire acylée par des groupes dodecanoyle préparée selon P. Zhang et coll. La taille moyenne des nanocapsules est de 300 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,1.  
10 Les nanocapsules peuvent être stérilisées à l'autoclave et lyophilisées comme celles avec 6 carbone.

**Exemple 8 :**

15 Préparation de nanocapsules de cyclodextrine modifiée à 14 carbones.  
On procède comme dans l'exemple 1, en remplaçant la cyclodextrine modifiée à 6 carbone par la cyclodextrine modifiée à 14 carbone, c'est à dire acylée par des 20 groupes tetradécanoyle. La taille moyenne des nanocapsules est de 110 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,1.  
Les nanocapsules de cyclodextrine modifiée à 14 carbone peuvent être stérilisées à l'autoclave ou autre et 25 lyophilisées comme celles avec 6 carbone.

**Exemple 9**

Stabilité des nanocapsules de cyclodextrine en présence de forces ioniques variables.

30 On procède comme indiqué dans l'exemple 1.  
Après concentration de la suspension de nanocapsules de cyclodextrine jusqu'à un volume de 10 ml, on ajoute progressivement à celle-ci des quantités croissantes de 35 chlorure de sodium. La suspension de nanocapsules est parfaitement stable lorsque la concentration en chlorure

de sodium correspond à l'isotonie avec le sang et le demeure jusqu'à une concentration supérieure à 3 fois la concentration isotonique.

5

**Exemple 10**

Stabilité des nanocapsules de cyclodextrine en présence d'un milieu acide ou basique.

On procède comme indiqué dans l'exemple 1.

10

Après concentration de la suspension de nanocapsules de cyclodextrine jusqu'à un volume de 10 ml, on ajoute progressivement à celle-ci des quantités croissantes d'acide chlorydrique (1N) ou de la soude (1N). La suspension de nanocapsules est parfaitement stable.

15

**Exemple 11**

Stabilité des nanocapsules de cyclodextrine à la température.

On procède comme indiqué dans l'exemple 1.

20

Après concentration de la suspension de nanocapsules de cyclodextrine jusqu'à un volume de 10 ml, on place chaque lot à 4°C, 25°C et 40°C.

Les suspensions demeurent stables dans le temps et ne présentent, après 14 mois de conservation, ni sédimentation irréversible, ni variation de la taille des nanocapsules.

25

**Exemple 12**

Préparation de nanocapsules en présence d'un sel.

30

On procède comme indiqué dans l'exemple 1, mais la phase aqueuse est additionnée de 90 mg de chlorure de sodium. Après concentration de la suspension de nanocapsules jusqu'à un volume de 10 ml, correspondant compte tenu du chlorure de sodium à l'isotonie avec le sang, les nanocapsules ont une taille moyenne de 320 nm avec un

indice moyen de dispersion de 1.

La suspension demeure stable dans le temps et ne présente, après 14 mois de conservation, ni sédimentation irréversible, ni variation de la taille des nanocapsules

5

#### Exemple 13

Addition de non-solvant dans la phase du solvant.

10 On procède comme dans l'exemple 1, la cyclodextrine est dissoute dans un mélange acétone/eau (90/10, v/v), au lieu d'acétone pure. La présence d'une faible proportion de non-solvant de la cyclodextrine dans un solvant, conduit à des nanocapsules dont la taille moyenne est de 15 380 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,5.

#### Exemple 14

Stabilité des nanocapsules de cyclodextrine aux ultrasons.

20 On procède comme dans l'exemple 1. Après concentration de la suspension de nanocapsules de cyclodextrine jusqu'à un volume de 10 ml, on place la suspension de nanocapsules de cyclodextrine dans un bain à ultrasons pendant trois heures.

25 La suspension demeure stable dans le temps et ne présente, après 14 mois de conservation, ni sédimentation irréversible, ni variation de la taille des nanocapsules.

#### Exemple 15

30 Préparation de nanocapsules en présence d'un principe actif hydrophile.

On procède selon l'exemple 1, mais on ajoute 10 mg de doxorubicine dans la phase aqueuse. Dans la phase 2 on utilise de l'éthanol et 0,5 ml de benzoate de benzyle.

35 Les nanocapsules obtenues ont une taille moyenne de 300

nm et un indice moyen de dispersion de 1. Après ultracentrifugation et dosage de la doxorurubicine dans la phase dispersante, la quantité de principe actif incorporé dans les nanocapsules représente 60% de la quantité initiale.

5

### Exemple 16

Préparation de nanocapsules en présence d'un principe actif lipophile.

On procède comme dans l'exemple 1, mais on ajoute 30 mg de d'indométacine et 0,3 ml de benzoate de benzyle dans la phase acétonique. Les nanocapsules obtenues ont une taille moyenne de 320 nm et un indice de dispersion de 0,5. Après ultracentrifugation et dosage de l'indométacine dans la phase dispersante, la quantité de principe actif incorporé dans les nanocapsules représente 90% de la quantité initiale.

### Exemple 17

## Préparation de nanocapsules contenant de la progestérone.

20 On procède comme dans l'exemple 1, mais on ajoute 230 mg de progestérone et 0,6 ml de benzoate de benzyle dans la phase 1. Les nanocapsules obtenues ont une taille moyenne de 120 nm et un indice de dispersion de 0,2. Après ultracentrifugation et dosage de la progestérone dans la phase dispersante, la quantité de principe actif incorporé dans les nanocapsules représente 90% de la quantité initiale.

### Exemple 18

30 Préparation de nanocapsules contenant un colorant lipophile le soudan III.

35 On procède comme dans l'exemple 1, mais on ajoute 5mg de soudan III dans la phase I. Une faible quantité est précipitée et reste sur le filtre. Les nanocapsules obtenues ont une taille moyenne de 130 nm et un indice

de dispersion de 0,2.

Les nanocapsules obtenues selon l'invention peuvent trouver des applications dans de nombreux secteurs techniques.

5 En tant que "vecteurs" de principe actif, en thérapeutique humaine et animale les nanocapsules permettent d'envisager :

10 d'atteindre de nouveaux sites d'action, en particulier intracellulaires, voire intralysosomiaux ; d'utiliser de nouvelles voies d'administration pour les principes actifs connus, en augmentant la stabilité et/ou l'absorption des principes actifs, ou en permettant la réalisation de formes injectables par voie intravasculaire, de principes actifs insolubles ;

15 de modifier la distribution tissulaire des principes actifs, par un meilleur ciblage vers des sites d'actions favorables et/ou un détournement des sites d'effets indésirables voire toxiques (amélioration de l'index thérapeutique).

20 En pharmacie, ces dispersions colloïdales de cyclodextrine peuvent permettre notamment :

de réaliser des formes injectables de médicaments insolubles, de stabiliser un principe actif médicamenteux...etc.

25 Dans le domaine de la phytopharmacie les nanocapsules peuvent véhiculer des insecticides, des pesticides, etc. Leur taille peut permettre d'envisager une action plus puissante par une meilleure pénétration à travers la cuticule. La faible viscosité de la dispersion autorise une pulvérisation très facile sous forme de gouttelettes de très petite taille plus efficaces car plus couvrantes.

30 35 En cosmétologie, les nanocapsules de cyclo-dextrine peuvent transporter des produits anti-radicalai-

res ou autres au niveau du derme.

Dans le domaine des peintures, vernis et traitements des surfaces d'une manière générale, les nanocapsules permettent de véhiculer des pigments, des réactifs, des décapants sous forme de dispersion aqueuse de très faible viscosité, aisée à pulvériser ou à appliquer, et qui peut, si nécessaire, être rendue visqueuse, voire adhésive (remise en suspension des nanosphères dans un véhicule approprié). La taille réduite des nanosphères conduit à une très grande finesse du dépôt et à une très grande homogénéité, par exemple de pigmentation.

Les nanocapsules obtenues selon l'invention peuvent être utilisées dans les domaines de l'imprimerie et de la regraphie, du traitement de surface des textiles et des fibres, ou autre, de la photographie, de la lubrification, de l'agriculture.

## REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un système colloïdal dispersible à base de cyclodextrine sous forme de nanocapsules, caractérisé en ce que

5 1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de cyclodextrine modifiée par des groupes acyle et d'une huile dans un solvant ou mélange de solvants organique(s) contenant ou non une surfactif et pouvant être additionnée d'une molécule active,

10 2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par de l'eau ou un mélange aqueux, contenant ou non un surfactif et pouvant être additionnée d'une molécule active, et

15 3) on ajoute sous agitation modérée, l'une des phases liquides obtenues sous (1) ou (2) à l'autre, de manière à obtenir pratiquement instantanément une suspension colloïdale de nanocapsules dont la paroi est constituée de cyclodextrine modifiée et la cavité est constituée d'huile contenant le cas échéant la molécule active.

20 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on élimine tout ou partie du solvant ou du mélange de solvants et de l'eau ou du mélange aqueux de manière à obtenir une suspension colloïdale de concentration voulue en nanocapsules ou à obtenir un poudre de nanocapsules.

25 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit solvant de la phase (1) est choisi parmi les alcools et les cétones ou leurs mélanges.

30 4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la cyclodextrine modifiée est une bêta-cyclodextrine estérifiée par des groupes alcanoyle de 2 à 20 atomes de carbone.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la cyclodextrine modifiée est une bêta-cyclodextrine estérifiée par des groupes alcanoyle de 6 à 14 atomes de carbone.

5 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la molécule active est un principe actif médicamenteux ou un précurseur médicamenteux à usage humain ou vétérinaire, un réactif biologique ou un principe cosmétique, un virus, un constituant de 10 virus, de bactérie ou de cellule, un antigène, un allergène ou une enzyme.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le rapport des volumes phase (1)/phase (2) est de 0,1 à 1.

15 8. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la totalité de l'eau est éliminée par lyophilisation.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le(s) 20 surfactif(s) est (sont) présent(s) en une proportion de 0,1 à 10%, de préférence 0,2 à 2% en poids de la suspension colloïdale obtenue dans l'étape 3.

10. Utilisation des nanocapsules de cyclodextrine modifiée obtenues suivant l'une quelconque des 25 revendications 1 à 9 comme vecteurs de principes actifs médicamenteux ou cosmétiques.

11. Utilisation des nanocapsules de cyclodextrine modifiée obtenues suivant l'une quelconque des revendications 1 à 9 comme vecteur de produits chimiques.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00593

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. 5 A61K9/51

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. 5 A61K ; B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 451 082 (LABORATORIOS CUSI) 9 October 1991 see page 2, line 27 - page 2, line 30 see page 2, line 53 - page 2, line 58 see page 3, line 1-5	1,2,6, 10,11
A	FR,A,2 551 072 (SANDOZ S A) 1 March 1985 see page 4, line 32 - page 4, line 34 see page 5, line 1-34 see page 6, line 1-6 see page 9, line 24 - page 9, line 34 see page 10, line 21 - page 10, line 31 see page 11, line 18 - page 11, line 23	1,2,4,5, 6,10,11
A	EP,A,0 274 961 (CNRS) 20 July 1988	1-3,8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
  - "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
  - "E" earlier document but published on or after the international filing date
  - "L" document which may raise doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)
  - "O" document referring to oral disclosure, use, exhibition or other means
  - "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- \*\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*\*\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*\*\*\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*\*\*\*\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 August 1993 (31.08.93)

Date of mailing of the international search report

16 September 1993 (13.09.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office  
Fax/phone No.

Authorized officer

Telephone No.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300593  
SA 75468

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EPO file on The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 31/08/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0451082	09-10-91	FR-A-	2660193	04-10-91
		JP-A-	4221322	11-08-92
FR-A-2551072	01-03-85	CH-A-	656884	31-07-86
		AT-B-	395584	25-01-93
		AU-B-	575066	21-07-88
		AU-A-	3234884	28-02-85
		BE-A-	900406	22-02-85
		DE-A-	3430852	14-03-85
		GB-A, B	2145422	27-03-85
		JP-A-	60076531	01-05-85
		LU-A-	85514	24-04-85
		NL-A-	8402547	18-03-85
		SE-B-	462098	07-05-90
		SE-A-	8404225	27-02-85
EP-A-0274961	20-07-88	FR-A-	2608942	01-07-88
		DE-A-	3777793	30-04-92
		JP-A-	63232840	28-09-88
		US-A-	5049322	17-09-91
		US-A-	5174930	29-12-92

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00593

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>						
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB 5 A61K9/51						
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE						
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>						
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Système de classification</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Symboles de classification</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">CIB 5</td> <td style="padding: 2px;">A61K ; B01J</td> </tr> </tbody> </table>			Système de classification	Symboles de classification	CIB 5	A61K ; B01J
Système de classification	Symboles de classification					
CIB 5	A61K ; B01J					
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>						
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS <sup>10</sup>						
Catégorie <sup>11</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>				
A	EP,A,0 451 082 (LABORATORIOS CUSI) 9 Octobre 1991 voir page 2, ligne 27 - page 2, ligne 30 voir page 2, ligne 53 - page 2, ligne 58 voir page 3, ligne 1-5 ---	1,2,6, 10,11				
A	FR,A,2 551 072 (SANDOZ S A) 1 Mars 1985 voir page 4, ligne 32 - page 4, ligne 34 voir page 5, ligne 1-34 voir page 6, ligne 1-6 voir page 9, ligne 24 - page 9, ligne 34 voir page 10, ligne 21 - page 10, ligne 31 voir page 11, ligne 18 - page 11, ligne 23 ---	1,2,4,5, 6,10,11				
A	EP,A,0 274 961 (CNRS) 20 Juillet 1988 ----	1-3,8				

<sup>7</sup> Catégories spéciales de documents cités<sup>11</sup><sup>8</sup> "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent<sup>9</sup> "B" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date<sup>10</sup> "C" document pouvant porter un doute sur une revendication de priorité ou citer pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telles qu'indiquées)<sup>11</sup> "D" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tout autre moyen<sup>12</sup> "E" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée<sup>13</sup> "F" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinente, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention<sup>14</sup> "X" document antérieur pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive<sup>15</sup> "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à une ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.<sup>16</sup> "A" document qui fait partie de la même famille de brevets

## IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 AOUT 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16.09.93

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

MEERTENS J.

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9300593  
SA 75468

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Cesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 31/08/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0451082	09-10-91	FR-A- 2660193 JP-A- 4221322	04-10-91 11-08-92
FR-A-2551072	01-03-85	CH-A- 656884 AT-B- 395584 AU-B- 575066 AU-A- 3234884 BE-A- 900406 DE-A- 3430852 GB-A, B 2145422 JP-A- 60076531 LU-A- 85514 NL-A- 8402547 SE-B- 462098 SE-A- 8404225	31-07-86 25-01-93 21-07-88 28-02-85 22-02-85 14-03-85 27-03-85 01-05-85 24-04-85 18-03-85 07-05-90 27-02-85
EP-A-0274961	20-07-88	FR-A- 2608942 DE-A- 3777793 JP-A- 63232840 US-A- 5049322 US-A- 5174930	01-07-88 30-04-92 28-09-88 17-09-91 29-12-92